

I-3 車前子由来物質のグリア細胞を介した疼痛伝達制御の分子メカニズム解析

医学部 病理診断学講座 助教 大橋 若 奈

【研究目的】

末梢神経障害は抗がん剤治療に伴う副作用の一つであり、休薬の指標として抗がん剤治療を妨げるのみならず、休薬の後も症状の持続が認められ生活の質をも大きく低下させる要因となっている。このようなことから末梢神経障害の緩和と治療薬の開発が求められているが、有効な治療法に乏しいのが現状である。抗がん剤の一種であるパクリタキセルも末梢神経障害の副作用を有する。パクリタキセル誘発性の末梢神経障害には、その機構としてマクロファージの関与が考えられている。パクリタキセルは、マクロファージの細胞膜上に発現する自然免疫受容体のリガンドとして作用することで、活性化を促し、炎症性サイトカインをはじめとした種々の炎症性メディエーターが産生され、これが末梢神経障害の増悪に寄与するとの考えである。

牛車腎気丸は抗がん剤投与による末梢神経障害の緩和に有効であることが報告されている。この有効性は、牛車腎気丸から車前子と牛膝を除いた八味地黄丸ではほとんど報告されていないことから、末梢神経障害の緩和には、車前子または牛膝由来成分の関与が示唆される。研究代表者の安東らは、車前子には神経障害性疼痛の軽減作用があることを報告し、その有効成分としてアウクビンと同定している。モデルマウスを用いた検討から、パクリタキセル誘導性末梢神経障害には中枢系の寄与が示唆されており、パクリタキセルは、中枢においては、グリア細胞に作用するとの知見も散見される。本研究にて、中枢で末梢神経障害誘導応答に対する、車前子由来成分であるアウクビンの効果を明らかとすることを目的として、グリア細胞の炎症応答へのアウクビンの抑制効果について検証を行ってきた。

グリア細胞の中でも最も数が多いのはアストロサイトであり、昨年度までの検討から、オキサリプラチンと LPS は炎症性サイトカインである IL-1 β と TNF α の遺伝子発現を誘導し、脊髄後角神経細胞などのニューロンへ作用しうるメディエーターの産生を促すことを見出した。つまり、アストロサイトは神経障害性疼痛機構への関わりが示唆される。また、アウクビンはアストロサイトに対して細胞毒性を示さなかったことから、アストロサイトの恒常性を大きく損なうことなくアストロサイトの機能の調節が可能となる候補分子であるが、解析の結果、アウクビンによるアストロサイトのオキサリプラチンまたは LPS 刺激によるメディエーター産生への抑制効果は認めなかった。

グリア細胞は、アストロサイトに加えて、中枢マクローファージと呼ばれるミクログリア、オリゴデンドロサイトから構成される。末梢でのパクリタキセルのマクローファージに対する作用を考慮し、中枢においての、パクリタキセルのミクログリアへの作用を検証した。昨年度までの検証では、マウス由来ミクログリア細胞株 MG6 細胞を用いた検討から、パクリタキセルは、ミクログリアに直接作用し、IL-6 や TNF α といった炎症性サイトカインの産生を促すのみならず、一酸化窒素といった炎症性物質の放出をも促し炎症応答を誘導することを見出した。すなわち、パクリタキセルはミクログリアからの神経障害性物質の産生の誘導を介して神経障害作用を発揮している可能性が示唆された。このようなパクリタキセルのミクログリアへの作用には、ミクログリア細胞膜上に発現する Toll-like Receptor (TLR)4 の活性化を介していると考えられ、TLR4 の活性化によりミクログリア細胞内では、リン酸化酵素、転写因子を含む様々なタンパク質分子が活性化し、炎症性サイトカインや一酸化窒素の産生へと繋がっていく。そこで、本年度は、炎症性サイトカインや一酸化窒素産生を促す、ミクログリア細胞内でのタンパク質分子活性化に対するアウクビンの作用について検証を行った。

【方法】

(ミクログリア細胞株)

マウス由来ミクログリア細胞株 MG6 細胞は理研 BRC より入手した。10 %のウシ胎仔血清、10 $\mu\text{g/ml}$ のウシインシュリンと 100 μM の 2-メルカプトエタノールを含んだダルベッコ変法イーグル培地にて 37 度 5%二酸化炭素環境下で培養を行い、継代数 20 以下の細胞を実験に用いた。

(試薬)

パクリタキセル (169-18611、富士フィルム和光純薬株式会社) は、ジメチルスルホキシドに溶解し、実験により 1-15 μM の濃度にて投与した。リポポリサッカライド (LPS B55:O5)は、DNase, RNase-free 水に溶解し、100 ng/ml の濃度にて投与した。車前子由来成分アウクビン (016-10351、富士フィルム和光純薬株式会社) は、生理食塩水に溶解し、100 μM の濃度にて投与した。

(ウエスタンブロット法によるタンパク質分子活性評価)

タンパク質分子の活性化は、ウエスタンブロット法により評価を行った。MG6 細胞に実験条件に応じて、パクリタキセル、または、LPS を投与した。一定時間培養した後、RIPA Lysis and Extraction Buffer (89900、サーモフィッシャーサイエンティフィック)を用いて細胞溶解液を調製した。SDS-PAGE 電気泳動後、セミドライ法によりイモビロン-P メンブレン (IPVH00010、ミリポア) へ転写した。0.02%の Tween-20 を含むトリス溶液を用いて 1 % に調製したアルブミン (01723294、富士フィルム和光株式会社) 溶液にて室温 1 時間のブロッキング反応を行った後、P65、リン酸化 p65、

I κ B α 、ERK、リン酸化 ERK、STAT3、リン酸化 STAT3、Akt、リン酸化 Akt、または、GAPDH に対する一次抗体と反応させ、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼが結合した二次抗体と反応させた。イムノスターゼータ (295-72404、富士フィルム和光株式会社)、または、アマシヤム ECL プライム (RPN2232、GE ヘルスケアサイエンス) 試薬により検出を行った。

【結果】

1) パクリタキセルにより活性化される炎症シグナル伝達経路に対するアウクビンの作用

パクリタキセルの作用により、炎症性サイトカインの産生を誘導する代表的なシグナル伝達経路である NF- κ B 経路が活性化される。そこで、ミクログリア細胞株 MG6 細胞におけるパクリタキセルによる NF- κ B シグナル活性化とそれに対するアウクビンの作用の解析を行った。MG6 細胞にパクリタキセルを 10 μ M の濃度で投与し、投与後 5 分、15 分、30 分、60 分、90 分の NF- κ B 複合体の構成因子である p65 タンパク質のリン酸化状態と p65 の抑制因子である I κ B α の存在量を検証した。

パクリタキセルにより NF- κ B シグナル経路が活性化すると、抑制因子である I κ B α の分解が起こる。定常状態では I κ B α は NF- κ B 構成因子である p65 と複合体を形成し活性化を抑制している。I κ B α が分解されると I κ B α による抑制が弱まり、p65 はリン酸化し活性化される。MG6 細胞においてもパクリタキセル投与により I κ B α のタンパク質量の減少と、p65 のリン酸化の亢進を認めた (図 1)。アウクビンの存在下においても、パクリタキセルによる I κ B α のタンパク質量の減少と、p65 のリン酸化の亢進が同程度に認められた。アウクビンによるパクリタキセルによる NF- κ B 経路活性化に対する抑制効果は認めなかった。

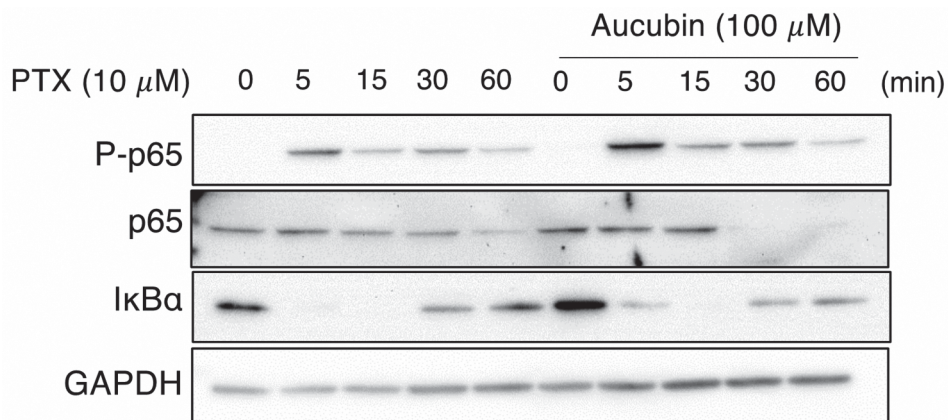


図 1. パクリタキセル刺激によるミクログリア細胞株 MG6 の NF- κ B シグナル経路活性化とアウクビンの効果。パクリタキセルの投与により NF- κ B シグナル分子である p65 の活性化と抑制因子である I κ B α の低下を認めた。アウクビンはこれらの変動に対して抑制効果を示さなかった。

2) LPS が活性化するシグナル伝達経路に対するアウクビンの作用：early phase への作用

LPS がミクログリアへ作用すると、NF- κ B 経路に加えて、ERK 経路の活性化も促される。ERK 経路も炎症性サイトカインの産生に關与するシグナル経路である。そこで、LPS 投与による NF- κ B 経路と ERK 経路の活性化に対するアウクビンの作用の解析を行った。ミクログリア細胞株 MG6 に LPS を 100 ng/ml の濃度で投与後、経時的に細胞を回収し、p65 タンパク質と ERK タンパク質のリン酸化レベルの検証を行った。その結果、LPS 投与後 15 分には p65 のリン酸化レベルの亢進を認め、30 分には ERK のリン酸化レベルの亢進を認めた (図 2)。一方で、これらのリン酸化レベルの亢進は、アウクビン処理群においても認めた。

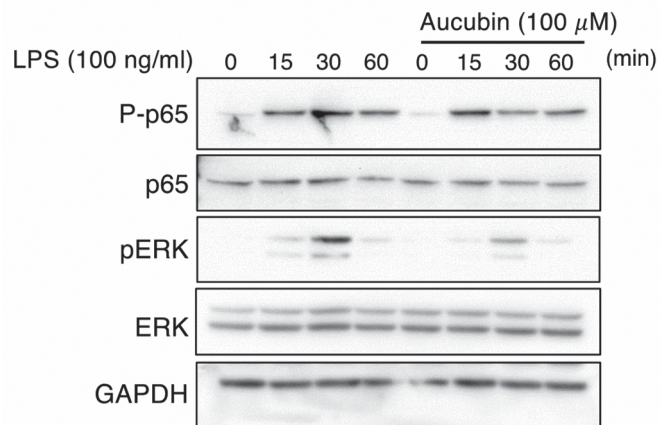


図 2. LPS 刺激によるミクログリア細胞株 MG6 の NF- κ B 及び ERK 経路活性化とアウクビンの効果。LPS の投与により NF- κ B シグナル分子である p65 のリン酸化、及び、ERK のリン酸化の亢進を認めた。アウクビンはこれらの変動に対して抑制効果を示さなかった。

3) LPS が活性化するシグナル伝達経路に対するアウクビンの作用：late phase への作用

LPS がミクログリアへ作用すると、早期には NF- κ B 経路や ERK 経路が活性化される。これらのシグナル経路の活性化は、種々のサイトカイン類が産生を誘導し、新たに産生されたサイトカインの作用により、更なるシグナル経路の活性化がおこる。このようなシグナル経路の代表的なものの一つが、STAT3 経路である。LPS による STAT3 経路活性化に対するアウクビンの作用の検証を行った。ミクログリア細胞株 MG6 に LPS を 100 ng/ml の濃度にて投与を行い、6 時間後に STAT3 のリン酸化レベルが上昇することを確認した (図 3)。この STAT3 のリン酸化レベルの高まりは、アウクビン存在下では抑制されていた。アウクビンは LPS による STAT3 経路を抑制することが示唆された。

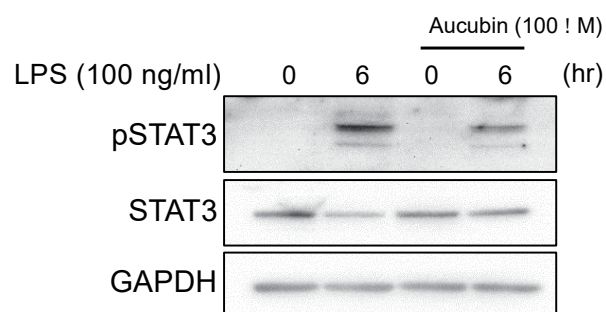


図 3. LPS の刺激による MG6 細胞の STAT3 活性化とアウクビンの効果。LPS の投与により STAT3 のリン酸化が誘導され、アウクビンにより LPS 誘導による STAT3 のリン酸化は減弱した。

【考察と今後の展望】

マウス脳ミクログリア由来細胞株 MG6 細胞を用いた解析により、パクリタキセルはミクログリアに作用し典型的な炎症性サイトカイン誘導シグナルの一つである NF- κ B シグナル経路を活性化することが示された。このような NF- κ B 経路の活性化に対してアウクビンは抑制効果を示さなかった。加えて、LPS 刺激による NF- κ B 経路の活性化に対してもアウクビンは減弱効果を示さなかった。これらのことからアウクビンは、ミクログリア MG6 細胞株においては NF- κ B シグナル経路活性化の抑制作用を有しないと考えられる。

パクリタキセルと LPS は共に TLR4 受容体のリガンドとして作用し、TLR4 受容体下流のシグナル経路の活性化を促す。TLR4 受容体では様々なシグナル経路が活性化されるが、NF- κ B はその代表的な経路であり、TNF α や IL-6 といった炎症性サイトカインの産生に重要な経路である。以前の我々の検討において、パクリタキセルや LPS の刺激により MG6 細胞では TNF α と IL-6 が産生され、これらの炎症性サイトカイン産生に対してアウクビンは抑制効果を示さないことを見出しているが、これはアウクビンが NF- κ B 経路の制御作用を示さないことがその機構の一つであると考えられる。

一方で、アウクビンは LPS 誘導性の STAT3 リン酸化の亢進を抑制した。これは、アウクビンは STAT3 経路を抑制する作用を有することを示唆する興味深い知見である。ミクログリア細胞株 MG6 細胞における STAT3 の活性化の意義としては、一酸化窒素の産生誘導がある。LPS 刺激により MG6 細胞からは一酸化窒素が産生されるが、これは LPS 刺激により発現が誘導された誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) の作用による。STAT3 は STAT1 と協調して iNOS の発現の誘導を担う。すなわち、LPS により活性化した MG6 細胞は、STAT3 の活性化を介して iNOS が発現し、これにより、一酸化窒素が合成され細胞外へと分泌される。細胞外へ放出された一酸化窒素は、中枢においては血管の拡張作用や、周辺の神経細胞の傷害作用が報告されていることから、アウクビンの STAT3

活性化抑制機構は、中枢におけるミクログリア由来の一酸化窒素による神経傷害からの保護戦略の立案に有用となるかもしれない。

LPS 刺激による STAT3 の活性化に重要な受容体が 2 種存在する。一つは TLR4 受容体であり、もう一つはインターフェロン α/β 受容体である。LPS は、TLR4 受容体と結合し、TLR4 受容体下流のシグナル経路が活性化する。この活性化によりインターフェロン β の遺伝子発現が誘導され、産生されたインターフェロン β は細胞外へ放出される。放出されたインターフェロン β はインターフェロン α/β 受容体に結合し、細胞内に局在するヤヌスキナーゼ (Janus kinase: JAK) が活性化し、STAT1 と STAT3 の活性化が誘導される。このように LPS による STAT3 の活性化はインターフェロン β とその受容体が重要な役割を果たす。アウクビンによる STAT3 の活性化抑制が、STAT3 への直接作用なのか、インターフェロン β を介した間接的な作用かについてはさらなる解析が必要である。

本検討により、パクリタキセルと LPS はミクログリア MG6 細胞に NF- κ B をはじめとする炎症誘導性のシグナル経路を活性化し、アウクビンは、これらのシグナル経路の中で STAT3 を選択的に抑制することを見出した。ミクログリアが活性化に伴い放出する様々なメディエーターは、ニューロンへの傷害作用を有することを考えると、アウクビンのミクログリアの STAT3 抑制作用は、末梢神経障害、疼痛制御を担う戦略の確立へ向けた有望な知見となることが期待される。

【公表論文】

Regulatory Role of GRK2 in the TLR signaling-mediated iNOS induction Pathway in microglial cells

Sailesh Palikhe, Wakana Ohashi, Takuya Sakamoto, Kohshi Hattori, Masaaki Kawakami, Tsugunobu Andoh, Hiromi Yamazaki, and Hattori Yuichi.

Front. Pharmacol. 2019 Feb 4;10:50 doi:10.3389/fphar.2019.00059

【研究協力者】

富山大学 医学部 病理診断学講座 井村穰二、下村明子

富山大学大学院 医学薬学教育部 分子医科薬理学講座 Sailesh Palikhe